TAGESRHYTHMISCHE VERÄNDERUNGEN IN DEN KONZENTRATIONEN UND IM EINBAU VON ^{3}H-LYSIN BEI HISTONEN UND NICHTHISTON-PROTEINEN AUS ZELLKERNEN DER RATTENLEBER

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peter Rzepka
aus Brandenburg (Havel)

Göttingen 1973

TAGESRHYTHMISCHE VERÄNDERUNGEN IN DEN KONZENTRATIONEN UND IM EINBAU VON ^{3}H-LYSIN BEI HISTONEN UND NICHTHISTON-PROTEINEN AUS ZELLKERNEN DER RATTENLEBER

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peter Rzepka
aus Brandenburg (Havel)

Göttingen 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7
Referent: Prof. Dr. L. Rensing
Korreferent: Prof. Dr. G. Birukow
Tag der mündlichen Prüfung: 12. 7. 1973

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	1
A. MATERIAL UND METHODEN	
1. Allgemeines	4
2. Isolation der Zellkerne	5
3. Extraktion der löslichen Kernfraktion	6
4. Trennung der Nukleinsäuren	6
5. Trennung der Proteine	6
6. Spektralphotometrische Bestimmung der Nukleinsäuren	8
7. Quantitative Bestimmung der Proteine	8
8. Elektrophoretische Charakterisierung der Histone	8
9. Messung der Impulsraten radioaktiver Fraktionen	9
B. ERGEBNISSE	
1. Proteingehalt der gewaschenen Zellkerne im Verlauf eines Tages	10
2. Histone	11
3. Histonfraktion F1	13
4. Die übrigen Histone	15
5. In vivo Inkorporation von ^{3}H-Lysin in die Histone	15
6. Nichthiston-Proteine	17
7. RNA-Gehalt der gewaschenen Zellkerne	19
8. Quantitative Zusammensetzung des Chromatins	20
C. DISKUSSION	21
D. ZUSAMMENFASSUNG	32
E. LITERATURVERZEICHNIS	34

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0008

EINLEITUNG

Zahlreiche zelluläre Funktionen weisen tagesrhythmische Änderungen auf, wie vor allem Untersuchungen an Rattenleber in vivo und in vitro gezeigt haben (Zusf. HARDELAND et al., 1973; HARDELAND im Druck). Diese Änderungen betreffen beispielsweise die RNA-Synthese (DÖRING und RENSING, 1973), den Einbau von markierten Aminosäuren in Proteine (LeBOUTON und HANDLER, 1970 und 1971), quantitative Veränderungen freier Aminosäuren im Cytoplasma (EHRHARDT, 1973), die Neusynthese und die Aktivitäten einer Anzahl Leberenzyme (WURTMAN und AXELROD, 1967; HARDELAND, 1969; GLASSER und SPELSBERG, 1972), die Kernmembranpermeabilität (KITTLICK, 1970), Veränderungen im endoplasmatischen Retikulum (CHEDID und NAIR, 1972) und das Verhältnis von freien zu gebundenen Ribosomen (DIEMINGER, 1973).

Diese Befunde machen es einerseits notwendig, alle Analysen zellulärer Prozesse unter dem Aspekt zeitlicher Veränderungen durchzuführen; sie gestatten auf der anderen Seite jedoch auch Rückschlüsse auf die kausalen Mechanismen zwischen einzelnen Funktionen: Eine bestimmte zeitliche Phasenbeziehung kann einer kausalen Beziehung entsprechen.

In einigen Fällen beruhen die Maxima von Enzymaktivitäten auf einer Neusynthese dieser Enzyme (HARDELAND, 1969). Es wäre denkbar, daß dem zeitlichen Auftreten dieser Maxima eine periodische Synthese spezifischer mRNA vorausgeht, der ein spezifisches Muster differenzieller Genaktivität zugrunde liegt. Derartige Aktivitätsmuster können z.B. als zeitweilig auftretende morphologische Veränderungen in den polytänen Chromosomen von Dipterenlarven als lokale Aufblähungen, den sogenannten Puffs, sichtbar werden. Das periodische Auftreten spezifischer Transkriptionsmuster (NAGEL, 1973) verlangt sowohl eine Auswahl

als auch eine Beschränkung bestimmter chromosomaler Funktionen und läßt auf komplexe Kontrollmechanismen schließen. Einige dieser Mechanismen könnten unmittelbar auf das Chromatin einwirken und dadurch die Transkription direkt kontrollieren. Dabei wird nicht nur der Zustand der DNA verändert, sondern es muß ebenso eine Wirkung auf die mit der DNA im Chromatin verbundenen Proteine angenommen werden, die ihrerseits Bestandteil dieser Mechanismen sind. Ob aber die rhythmischen Genfunktionen direkt an einer zellulären Grundrhythmik (RENSING, 1967) beteiligt sind oder nur indirekt von ihr gesteuert werden, ist bisher unbekannt. Eine indirekte Beeinflussung der primären Genfunktion ist durch Faktoren denkbar, die z.B. die Aktivität der für die RNA-Synthese verantwortlichen Enzyme kontrollieren oder die Permeabilität der Kernmembran beeinflussen und damit die Austauschrate von Substanzen zwischen Zellkern und Cytoplasma steuern oder anderen, die die Stabilität von Genprodukten oder die Poolgrößen verschiedener Substrate verändern. Neben zellulären Regelsystemen sind bei höheren Organismen hormonelle und nervöse Kontrollmechanismen in diese Überlegungen einzubeziehen. Diese Mechanismen sind wahrscheinlich für die Synchronisation der zellulären Rhythmen mit tagesperiodischen Licht- oder Temperatur-Zeitgebern verantwortlich (Zusf. RENSING, 1973).

Für das Verständnis der Synchronisation von Einzelfunktionen auf der Transkriptionsebene erscheint das tagesperiodische Verhalten der mit der DNA assoziierten Proteine von Bedeutung. Diese Proteine sind dafür bekannt, durch ihre Wechselwirkung mit der DNA deren Struktur zu beeinflussen und die Funktion des Chromatins zu modifizieren. Zu ihnen gehören die Histone und die weniger gut definierten Bestandteile der "Rest-Protein-Fraktion".

Die Analyse tagesperiodischer Schwankungen der Menge und der Synthese dieser Proteine sollte die Kenntnis der circadianen Organisation primärer Genfunktionen erweitern und dazu beitragen, das System zeitlicher Abhängigkeiten der einzelnen Rhythmen in der Zelle vollständiger zu erfassen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. L. Rensing, danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für sein großes Interesse am Fortgang und den Ergebnissen meiner Arbeit.

MATERIAL UND METHODEN

Allgemeines

Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden in Boxen von 60 x 60 x 30 cm zu 10 Tieren bei einer Temperatur von ca. 23°C und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12 : 12 Stunden (Licht von 6.00 - 18.00 Uhr MEZ; Dunkel von 18.00 - 6.00 Uhr MEZ) gehalten und einmal täglich zwischen 17.00 und 18.00 Uhr mit ALTROMIN^{R} ausreichend gefüttert. Die Wasserversorgung erfolgte über eine automatische Tränke. Für die Versuche verwendete ich den mittleren und linken Leberlappen von 4 bis 6 Monate alten Tieren, deren Körpergewicht zwischen 240 und 320 g lag.

Alle für die Untersuchungen erforderlichen Chemikalien (MERCK-Darmstadt) waren von analytischem Reinheitsgrad oder für biochemische Zwecke. Die für die Herstellung von Vergleichslösungen benötigten Standardsubstanzen, Kälberthymus-DNA, Hefe-RNA und Rinderserumalbumin stammten von der Firma SERVA. L-Lysin-4,3 H3 (n) Monohydrochlorid mit einer spezifischen Aktivität von 7,5 Ci/mmol und 41 mCi/mg bezog ich über die Firma BUCHLER & CO. vom RADIOCHEMICAL Centre Amersham, England. Es wurde in einer Konzentration von 100 µCi/ml in physiologischer NaCl-Lösung den Ratten intraperetoneal (100 µCi/100 g Körpergewicht) vier Stunden vor dem Töten injiziert.

Zur Homogenisation habe ich Potter-Elvehjem-Homogenisatoren von 15 bzw. 30 ml Fassungsvermögen mit motorgetriebenen Teflon-Pistill benutzt. Die Zentrifugationen führte ich in Tischzentrifugen (JUNIOR) und Kühlzentrifugen (OMIKRON bzw. OMEGA) der Firma CHRIST mit Schwenkbecherrotoren bei 2°-4°C durch. Die Messung der Impulsraten von radioaktiv markierten Proteinen erfolgte in einem TRICARB Modell 3320 Flüssigkeits-Szintillationszähler der Firma PACKARD. Als Szintillationsflüssigkeit diente ausschließlich Instagel^{R} der Fa. PACKARD. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten photometrisch im Spektralphotometer PMQ II der Firma ZEISS mit 10 mm Quarz-Küvetten.

Isolation der Zellkerne

Im Abstand von 4 Stunden wurden je drei Tiere aus verschiedenen Käfigen durch Genickschlag getötet. Der linke und mittlere Leberlappen wurden sofort herauspräpariert, mehrfach eingeschnitten und zwischen Fließpapier gelegt, um äußerlich anhaftende Blutreste zu entfernen. Das in den Gefäßen befindliche Blut wurde durch leichten Druck zum Austritt gebracht und vom Fließpapier aufgesogen. Alle folgenden Arbeiten führte ich bei einer Temperatur von 2° - 4°C durch.

Zur Isolierung der Zellkerne modifizierte ich die Methode von CHAUVEAU et al. (1956). 5 Gramm der mit einer Schere zerkleinerten Leber wurden in 15 ml 0,25 M Saccharose - 3 mM $CaCl_2$ desintegriert. 10 bis 12 Durchgänge des Pistills waren in der Regel ausreichend, um die Zellen zu zerstören. Das Homogenat wurde anschließend durch Gaze filtriert, um nicht zerstörtes Bindegewebe, Teile des Pfortadersystems und der Gallengänge abzutrennen. Das Filtrat wurde mit 15 %iger Saccharose - 3 mM $CaCl_2$ unterschichtet und 10 min lang bei 2800 g zentrifugiert. Das Sediment dieser Zentrifugation versetzte ich nach dem Entfernen des Überstandes mit etwa dem gleichen Volumen einer 2,4 M Saccharose - 3 mM $CaCl_2$-Lösung. Nach kurzer Zeit lösten sich die Pellets aufgrund ihres geringeren spezifischen Gewichts vom Boden der Röhrchen, während die zuerst sedimentierten Blutreste haften blieben. Die abgelösten Pellets homogenisierte ich eingehend im gleichen Medium und füllte anschließend auf das 10-fache Volumen auf. Das gut verrührte Homogenat wurde in Zellulosebecher gefüllt und bei 40 000 g 90 min lang zentrifugiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes suspendierte ich das weiße bis leicht rosa gefärbte Kernpellet im 12 ml 0,25 M Saccharose - 3 mM $CaCl_2$ im Homogenisator bei niedriger Drehzahl und zentrifugierte anschließend die erhaltene Suspension 10 min lang bei 2800 g. Die Reinheit der erhaltenen Kernfraktion wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop geprüft.

Extraktion der löslichen Kernfraktion

Die lösliche Kernfraktion beinhaltet nach BUSCH et al. (1966) ribosomale Vorläufer, Lipoproteide, RNA und Enzyme. Vor der Isolierung der Histone und der sauren Chromatinproteine müssen diese Substanzen entfernt werden, da sie später nicht mehr selektiv vom Chromatin getrennt werden können. Die gereinigten Zellkerne wurden in 0,25 M Saccharose - 4 mM $MgCl_2$ - 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 8,3 (SMT) suspendiert und zentrifugiert (POGO et al., 1968) . Die Zellkerne wurden dreimal in SMT gewaschen. Anschließend suspendierte ich das Sediment in 0,01 M Zitronensäure, und nach Einstellung auf ein Volumen von genau 10 ml entnahm ich unter gleichmäßigem Rühren die für die einzelnen Trennungsgänge und Bestimmungen erforderlichen Mengen.

Eine Probe (1 ml) diente zur Trennung und Bestimmung von RNA, DNA und Gesamtprotein. Eine zweite Probe (7 ml) war für die Trennung von Histon und Nichthistonprotein vorgesehen.

Nach dieser Aufteilung wurden die Kerne sedimentiert und einmal in 88 % Äthanol - 0,01 N HCl gewaschen, um eine tryptophanhaltige säurelösliche Proteinfraktion zu entfernen (POGO et al., 1968).

Trennung der Nukleinsäuren

Das Sediment der Probe 1 wurde zweimal in 5 %iger Perchlorsäure (PCS) gewaschen und anschließend nach der bei SHIBKO et al. (1967) im Schema A beschriebenen Methode aufgetrennt. Die Nukleinsäureextrakte wurden bis zur Bestimmung in 50 ml-Kolben aufbewahrt. Die nach der Extraktion verbliebenen Proteine wurden in Aceton und Äther gewaschen und anschließend getrocknet und in 1 N NaOH gelöst.

Trennung der Proteine

Die gewaschenen Zellkerne der Probe 2 wurden mit Hilfe des Teflon-Homogenisators in 10 ml 5 %iger Perchlorsäure suspendiert, 15 min gerührt

und 30 min bei 1800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgehoben und der Niederschlag zwei weitere Male mit jeweils 10 ml PCS auf die gleiche Weise behandelt. Der vereinigte Überstand der drei Zentrifugationen wurde durch eine Glasfritte 3D4 (Porenweite 14 µm) filtriert und das Protein mit einer Konzentration von 18 % Trichloressigsäure (1,1 M) im Extrakt ausgefällt. Die Mischung wurde ca. 10 Stunden in der Kühlkammer bei 2 bis 4°C stehen gelassen, der gebildete Niederschlag durch Zentrifugieren gesammelt, zweimal mit Aceton gewaschen und in der Kälte unter Vakuum im Exsiccator getrocknet. Ich erhielt eine weiße, leicht wasserlösliche Substanz. Diese entspricht der von JOHNS (1964) als F1 bezeichneten Histonfraktion.

Das nach dieser Extraktion verbliebene Sediment wurde in 10 ml 0,2 N HCl suspendiert und eine Stunde lang unter Rühren bei 2 bis 3°C extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde nochmals mit 10 ml 30 min lang extrahiert und anschließend einmal mit HCl gewaschen. Die vereinigten Auszüge wurden filtriert und das Histon durch Zugabe von 10 Volumina Aceton ausgefällt. Durch Zentrifugieren wurden die Histone vom Überstand getrennt und nach zweimaligem Waschen mit Aceton im Vakuum getrocknet.

Das nach der Säureextraktion erhaltene Pellet wurde in 5 %iger PCS suspendiert und bei 75°C im Wasserbad 30 min lang erhitzt. Dabei hydrolysieren die Nukleinsäuren, während die sauren Proteine als Niederschlag zurückbleiben. Nach der Zentrifugation wird das Pellet einmal in 1,5 %iger PCS gewaschen und in 2 ml 1N NaOH suspendiert und in der Kühlkammer bei 2°C 24 Stunden lang unter gelegentlichem Rühren stehen gelassen. Dabei gehen die sauren Proteine in Lösung.

Die erhaltenen Histonfraktionen wurden in Aqua dest. gelöst und in geeichten Kolben auf 50 ml eingestellt. Die Lösung der sauren Proteine wurde mit 1 N NaOH auf 50 ml aufgefüllt.

Spektralphotometrische Bestimmung der Nukleinsäuren

Proben der in 50 ml-Kolben aufbewahrten Nukleinsäureextrakte wurden in Quarzküvetten bei 268 nm und 260 nm, entsprechend den Extinktionsmaxima von DNA und RNA, gegen 0,5 N bzw. 1 N Perchlorsäure bei etwa 25°C gemessen. Die den abgelesenen Extinktionswerten entsprechenden Konzentrationen wurden Standardkurven entnommen.

Quantitative Bestimmung der Proteine

Für die Bestimmung der Proteine wurde die Methode von LOWRY et al. (1951) angewandt. Im Reagenz B wurde Natriumtartrat durch Natriumcitrat ersetzt, da hierdurch die Lösung länger haltbar blieb. Eine Auswirkung auf die Ergebnisse konnte nicht festgestellt werden. Das Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (MERCK) wurde vor dem Gebrauch mit dem gleichen Volumen Aqua dest. verdünnt. Die Proben wurden in 1cm-Küvetten bei 750 nm photometriert. Als Nullstandard bei der Messung der Gesamtproteine und der sauren Proteine diente eine Lösung aus 1 ml 1 N NaOH, 10 ml Reagenz D und 1 ml Reagenz E. Die Histone wurden gegen eine Lösung bestehend aus 1 ml Aqua dest., 5 ml Reagenz C und 0,5 ml Reagenz E gemessen. Zur Ermittlung der den Extinktionswerten entsprechenden Konzentrationen diente eine auf der Basis von Rinderserumalbumin erstellte Eichkurve für die Gesamt- und sauren Proteine und eine auf der Grundlage von Rattenleberhiston für die Histone.

Elektrophoretische Charakterisierung der Histone

Zur Charakterisierung der Histone mittels Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese wurde die Methode von REISFELD et al. (1962) modifiziert. Alle Gellösungen enthielten 6 M Harnstoff, um die Aggregation der Histone herabzusetzen. Die Gele wurden in Glasröhrchen (5mm x 70 mm)

bereitet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von 3 mA pro Röhrchen 2 Stunden lang in der Kühlkammer bei ca. 4°C durchgeführt. Die Gele wurden in 1 % Amidoschwarz 10 B in 7 %iger Essigsäure gefärbt und elektrophoretisch entfärbt.

Messung der Impulsraten radioaktiver Fraktionen

1 ml-Proben der in wässriger Lösung vorliegenden Histonfraktionen wurden in 10 ml Instagel^{R} gemessen. Die basische Lösung der übrigen Proteine mußte zuvor mit Trichloressigsäure neutralisiert werden. 0,5 ml-Proben wurden mit 0,5 ml 1 N TCS im Szintillationsröhrchen versetzt und dazu pipettierte ich sofort 10 ml Instagel^{R}.

ERGEBNISSE

Proteingehalt der gewaschenen Zellkerne im Verlauf eines Tages

Die Menge der Chromatinproteine aus Rattenleberzellkernen zeigt tagesperiodische Veränderungen. Ausgehend von einem Maximum um 24.00 Uhr verzeichnet die Kurve bis 4.00 Uhr einen leichten Abfall und hält sich bis zum Mittag auf etwa dem gleichen Niveau, um danach ihren tiefsten Punkt um 16.00 Uhr zu erreichen (Abbildung 1a). Das dargestellte Protein-DNA-Verhältnis bewegt sich zwischen 1,878 um 24.00 Uhr und 1,674 um 16.00 Uhr. Die Mittelung aller über 24 Stunden erhaltenen Einzelergebnisse von 54 Tieren ergibt ein Protein-DNA-Verhältnis von 1,773 mit einem dreifachen mittleren Fehler von ± 0,052.

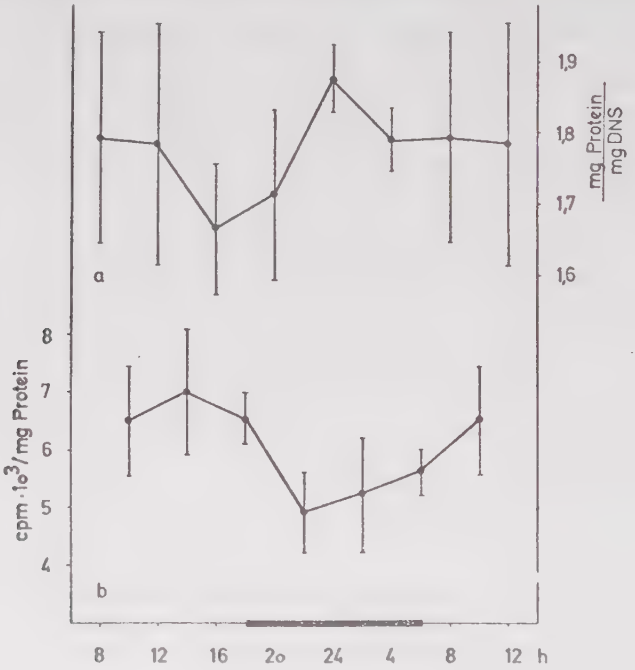

Abbildung 1. Gesamtchromatinprotein aus Zellkernen der Rattenleber über 24 Stunden.
a. Proteingehalt des Chromatins bezogen auf die DNA-Menge
b. Spezifische Aktivität der Chromatinproteine
Die Dunkelperiode ist durch den schwarzen Balken in der Abzisse gekennzeichnet. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert von 9 Tieren und die senkrechten Strecken den dreifachen mittleren Fehler.

Der Einbau von ^{3}H-Lysin in diese Proteine ist am Tage am höchsten und liegt in den Nachtstunden signifikant niedriger (Abbildung 1b). Ausgehend von dem Minimum zwischen 20.00 und 24.00 Uhr mit einer spezifischen Aktivität von 4910 cpm/mg Protein steigt die Einbaurate kontinuierlich bis 16.00 Uhr an und erreicht den Wert 6980 cpm pro mg Protein. Bezogen auf den DNA-Gehalt liegt der höchste Wert zwischen 12.00 und 16.00 Uhr mit 12070 cpm/mg DNA, der niedrigste zwischen 24.00 und 4.00 Uhr mit 9390 cpm/mg DNA.
Besonders auffällig ist die hohe Markierung der um 16.00 und 20.00 Uhr isolierten Proteine. Sie deutet auf den Einbau von neusynthetisierten Proteinen in das Chromatin hin, während die relativ niedrige Aktivität der bis Mitternacht zunehmenden Proteinmenge auf eine Anlagerung vorwiegend zuvor synthetisierter und daher schwächer markierter Moleküle schließen läßt. Möglicherweise werden die vor allem während der Nachmittagsstunden synthetisierten Proteine in einem extrachromosomalen Pool gespeichert, woraus sie zu einem späteren Zeitpunkt abgerufen werden können.

Um genauere Aufschlüsse über den Anteil einzelner Proteingruppen am Zustandekommen dieser periodischen Schwankunken zu erhalten, wurden die säurelöslichen Histone von den Nichthistonen getrennt untersucht.

Histone

Bezogen auf den DNA-Gehalt zeigen die Histone quantitative Schwankungen über 24 Stunden. Von einem Histon-DNA-Verhältnis von 1,065 um 16.00 Uhr steigt die Histonmenge auf ein Verhältnis von 1,196 um 20.00 Uhr an und fällt bis 4.00 Uhr auf den Wert 1,112 ab und bleibt bis zum Mittag auf etwa dieser Höhe (Abbildung 2a). Als Mittelwert aller Einzelergebnisse ergibt sich ein Histon-DNA-Verhältnis von 1,135 $\pm$ 0,032.

Der Einbau von ^{3}H-Lysin in diese basischen Proteine zeigt, bezogen auf die Histonmenge, einen zu der Gehaltskurve nahezu inversen Verlauf. Die niedrigsten Einbauwerte liegen nachts zwischen 20.00 und 4.00 Uhr mit einer spezifischen Aktivität von 2015 cpm/mg Histon. Die Radioaktivität steigt danach bis um 12.00 Uhr auf 3390 cpm an und erreicht um 20.00 Uhr 3640 cpm/mg Histon (Abbildung 2b). Bezogen auf den DNA-Gehalt ergibt sich das gleiche Bild. Zwischen 20.00 und 4.00 Uhr erhalte ich 2350 cpm/mg DNA als niedrigsten Wert, und bis zum Abend ist ein kontinuierlicher Anstieg auf 4350 cpm/mg DNA um 20.00 Uhr zu verzeichnen.

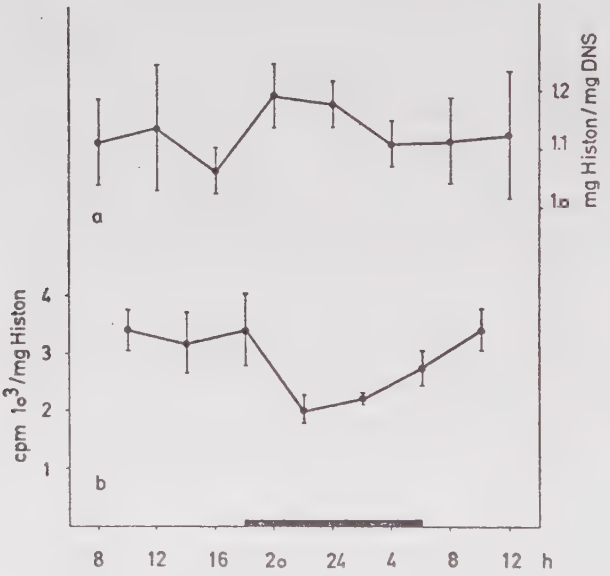

Abbildung 2. Histone aus den Zellkernen der Rattenleber über 24 Stunden.
a. Histongehalt des Chromatins bezogen auf die DNA-Menge
b. Spezifische Aktivität der Histone nach vierstündiger in vivo Inkorporation von ^{3}H-Lysin (100 µCi/100g KG)
Übrige Einzelheiten wie in Abbildung 1.

Histonfraktion F1

Da man für die lysinreiche Histonfraktion abweichende Eigenschaften gegenüber den anderen Histonen vermutet (GURLEY und HARDIN, 1969 und 1970), wurde diese Fraktion gesondert extrahiert.

Bezogen auf den DNA Gehalt (Abbildung 3b) und die Histongesamtmenge (Abbildung 4b) zeigt diese Fraktion nur geringe quantitative Schwankungen über 24 Stunden.

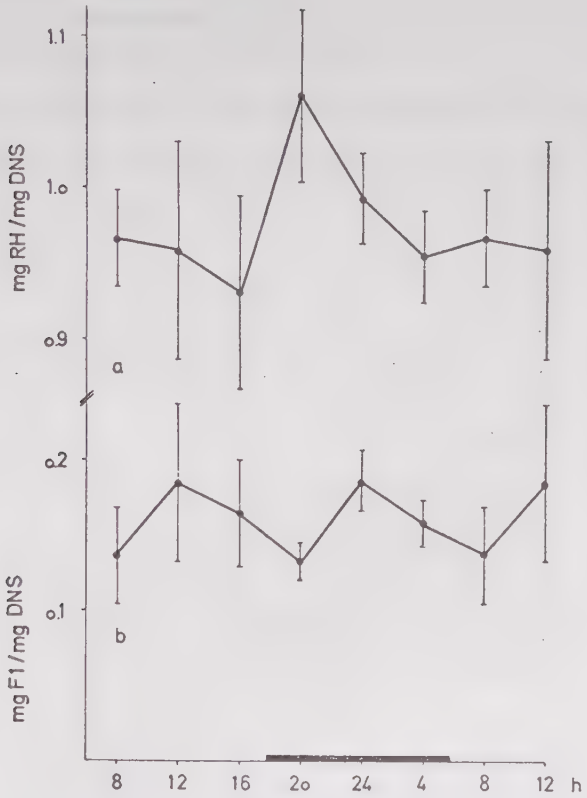

Abbildung 3. Histongehalt der Zellkerne bezogen auf den DNA-Gehalt über 24 Stunden, dargestellt für die lysinreiche Histonfraktion (F1) und die übrigen Histone.
a. Menge der übrigen Histone (RH)
b. Menge der lysinreichen Histonfraktion (F1)
Sonstige Einzelheiten wie in Abbildung 1.

In einer zweigipfligen Kurve liegen die höchsten Werte für das F1-DNA-Verhältnis mit 0,186 um 12.00 Uhr und 0,187 um 24.00 Uhr. Die niedrigsten Werte um 8.00 Uhr und 20.00 Uhr sind durch die F1-DNA-Verhältnisse 0,137 bzw. 0,132 charakterisiert. Von diesen läßt sich lediglich der 20.00-Uhr-Wert gegenüber dem Maximum um 24.00 Uhr absichern. Als Mittelwert für das Verhältnis dieser Fraktion zur DNA wurde 0,161 ± 0,015 errechnet.

Die Darstellung der auf die Gesamthistonmenge bezogenen Werte für die lysinreiche Histonfraktion zeigt einen zu der zuvor beschriebenen Kurve parallelen Verlauf. Die Extremwerte weisen Maxima um 12.00 Uhr mit einem Verhältnis von 0,160 und um 24.00 Uhr von 0,161 aus; die Minima um 8.00 und 20.00 Uhr besitzen die Werte 0,124 bzw. 0,120.

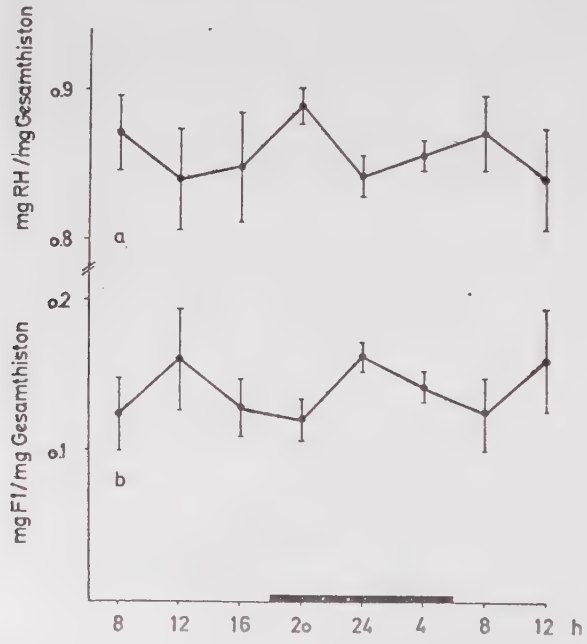

Abbildung 4. Gehalt der Zellkerne an lysinreichen und an übrigen Histonen, bezogen auf den Gesamthistongehalt.
a. Menge der Resthistone (RH)
b. Menge der lysinreichen Histonfraktion (F1)

Die übrigen Histone

Die nach der Abtrennung der lysinreichen Fraktion verbliebenen Histone wurden ebenfalls quantitativ bestimmt. Bezogen auf die DNA-Menge (Abbildung 3a) und die Gesamthistonmenge (Abbildung 4a) wurde um 20.00 Uhr das höchste Verhältnis mit 1,064 bzw. 0,689 gemessen. Dieses Ergebnis liegt signifikant sowohl über dem niedrigsten 16.00-Uhr-Wert mit 0,913 und den um 4.00 und 8.00 Uhr gemessenen Mengen für das Resthiston-DNA-Verhältnis als auch über dem niedrigsten 12.00-Uhr-Wert mit 0,841 und den Ergebnissen um 24.00 und 4.00 Uhr für das Resthiston-Gesamthiston-Verhältnis.

Das Verhältnis der Resthistone zur DNA beträgt im Mittel 0,981 ± 0,027.

Ein Vergleich der Kurven beider Fraktionen (Abbildung 3a und b) zeigt keinen parallelen Verlauf. Während die lysinreiche Fraktion von 20.00 bis 24.00 Uhr eine Zunahme verzeichnet, akkumulieren die restlichen Histone bereits vier Stunden früher. Daraus ergibt sich um 20.00 Uhr eine inverse Lage der Extremwerte. Dieses unterschiedliche Verhalten könnte auf eine für die lysinreichen Histone besondere Funktion hinweisen.

In vivo Inkorporation von ^{3}H-Lysin in die Histone

Die Markierung dieser basischen Proteine mit ^{3}H-Lysin zeigt ebenfalls ausgeprägte tagesperiodische Unterschiede. Die Histonfraktion F1 zeigt einen deutlichen Gipfel in den Abendstunden für die Inkubationszeit zwischen 16.00 und 20.00 Uhr mit 11 160 cpm/mg F1, während in den darauffolgenden vier Stunden nur 4160 cpm/mg F1 eingebaut werden (Abbildung 5a). Die auf den DNA-Gehalt bezogenen Aktivitätsmengen bewegen sich zwischen 1570 cpm um 20.00 Uhr und 690 cpm/mg DNA um 4.00 Uhr.

Die Resthistone weisen gegenüber der lysinreichen Fraktion eine auffallend schwächere Markierung auf (Abbildung 5b). Ausgehend von einer niedrigen Inkorporationsrate der um 24.00 Uhr isolierten Resthistone, die bei 1570 cpm/mg Resthiston und 1590 cpm/mg DNA liegt, steigen die Werte

kontinuierlich bis zum Mittag auf 3050 cpm/mg Resthiston und 2550 cpm/mg DNA an und bleiben auf diesem Niveau bis 20.00 Uhr. Die zwischen 20.00 und 8.00 Uhr gemessenen Einbauraten liegen signifikant niedriger als die zwischen 12.00 und 20.00 Uhr erhaltenen.

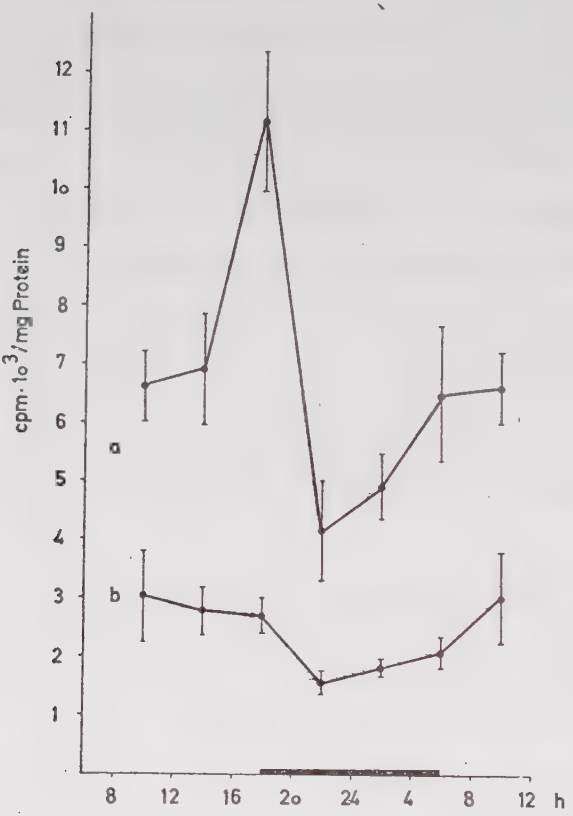

Abbildung 5. In vivo Inkorporation von ^{3}H-Lysin in die lysinreiche Histonfraktion F1 und die übrigen Histone der Rattenleber über 24 Stunden.
a. Spezifische Aktivität der lysinreichen Fraktion (F1)
b. Spezifische Aktivität der Resthistone
Übrige Details wie in Abbildung 1.

Nichthistonproteine

Da die Nichthistonproteine möglicherweise den inhibitorischen Effekt der Histone auf die Genaktivität aufzuheben vermögen, untersuchte ich ihren Anteil am Chromatin und die Einbauraten von ^{3}H-Lysin über 24 Stunden. Die aus den Zellkernen nach der Histonextraktion isolierten Proteine zeigen tagesperiodische Mengenschwankungen (Abbildung 6a). Ausgehend von einem Protein-DNA-Verhältnis von 0,699 um Mitternacht sinkt der Anteil dieser Proteine kontinuierlich bis auf den Wert 0,523 um 20.00 Uhr ab. Im Mittel aller Einzelanalysen beträgt das Nichthiston-DNA-Verhältnis 0,638 ± 0,038.

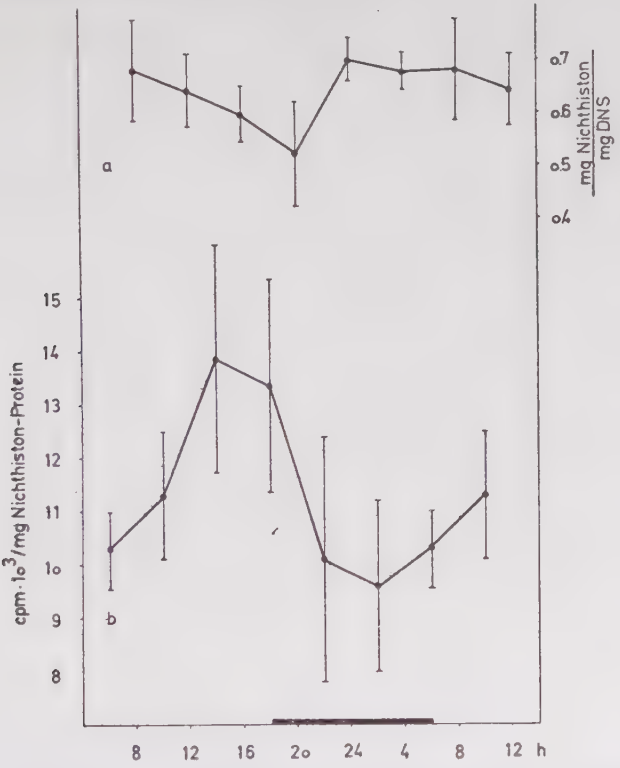

Abbildung 6. Menge der Nichthistonproteine und ihre spezifische Aktivität nach in vivo Inkorporation von ^{3}H-Lysin aus Zellkernen der Rattenleber über 24 Stunden.
a. Gehalt des Chromatins an Nichthistonprotein, bezogen auf die DNA-Menge
b. Spezifische Aktivität der Nichthistonproteine
Übrige Einzelheiten wie in Abbildung 1.

Ebenfalls von der Tageszeit abhängig erweist sich der Einbau von ^{3}H-Lysin in die Nichthistonproteine (Abbildung 6b). Die höchste spezifische Aktivität nach der vierstündigen Inkubationszeit wurde um 16.00 Uhr mit 13870 cpm gemessen, während um 4.00 Uhr nur 9610 cpm gezählt wurden. Auffallend hoch sind die durch größere individuelle Unterschiede bedingten Fehlerquoten.

Da die Inkubationszeit von vier Stunden speziell auf die Histone abgestimmt war, die Nichthistone aber einen höheren Stoffwechsel haben,

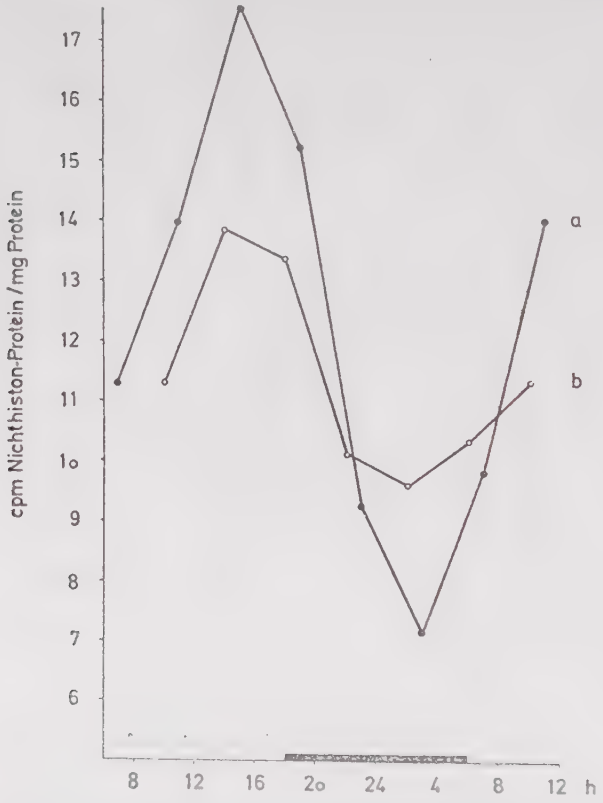

Abbildung 7. In vivo ^{3}H-Lysin Einbau in die Nichthistonproteine der Rattenleberzellkerne über 24 Stunden.
a. Inkubationszeit 2 Stunden. Jeder Punkt repräsentiert das Mittel von [illegible].
b. Inkubationszeit 4 Stunden. Gleiche Kurve wie in Abb. 6b, jedoch ohne Fehlerangabe.

wurden die Inkorporationsraten dieser Proteine in einem besonderen Experiment mit insgesamt 18 Tieren nach zweistündiger Inkubationszeit bestimmt (Abbildung 7a). Die Extremwerte liegen übereinstimmend um 16.00 und 4.00 Uhr. Die Kurve zeigt aber einen ausgeprägteren Verlauf.

RNA-Gehalt der gewaschenen Zellkerne

In der Abbildung 8 sind die aus den gewaschenen Zellkernen extrahierten RNA-Mengen bezogen auf den DNA-Gehalt über 24 Stunden aufgetragen. Diese am Chromatin verbliebene RNA wurde nicht näher spezifiziert.

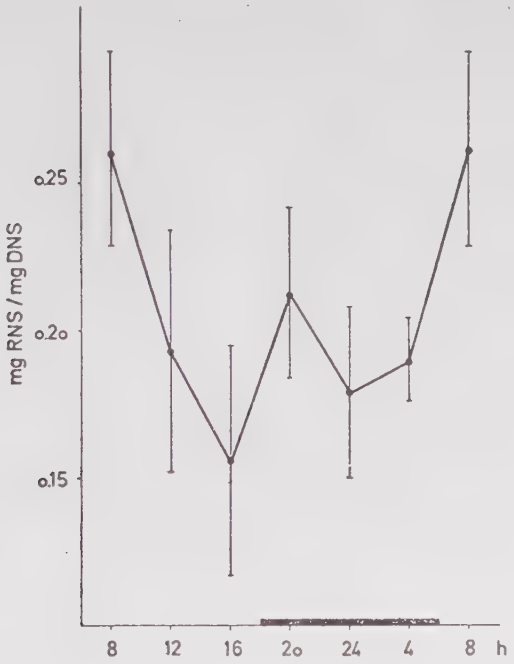

Abbildung 8. RNA-Gehalt der gewaschenen Rattenleberzellkerne, bezogen auf den DNA-Gehalt, über 24 Stunden. Sonstige Einzelheiten wie in der Abbildung 1.

Von einem höchsten RNA-DNA-Verhältnis mit 0,262 um 8.00 Uhr fällt die Kurve steil zu dem niedrigsten Wert von 0,157 um 16.00 Uhr ab, um über einen Zwischengipfel um 20.00 Uhr (RNA:DNA = 0,213), ab 24.00 Uhr (RNA:DNA = 0,179) wieder steil bis 8.00 Uhr anzusteigen.
Der Mittelwert für das RNA-DNA-Verhältnis aller Analysen beträgt 0,199 ± 0,019.

Quantitative Zusammensetzung des Chromatins

Die Mittelwerte aller Einzelergebnisse der quantitativen Zusammensetzung des Chromatins, bezogen auf den DNA-Gehalt, sind in der folgenden Tabelle mit der Angabe des dreifachen mittleren Fehlers aufgeführt.

DNA	1,000
Gesamtprotein	1,772 ± 0,052
Histon	1,135 ± 0,032
F1	0,161 ± 0,015
Nicht-Histon	0,638 ± 0,038
RNA	0,199 ± 0,019

DISKUSSION

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Tagesrhythmen in der Menge und der Synthese von Histonen und sauren Kernproteinen sind zunächst von den angewandten Extraktionsmethoden her zu diskutieren.
Es ist beispielsweise bekannt, daß Chromatin generell Proteine zu binden vermag, sowohl einige Proteine des Karyoplasmas als auch des Cytoplasmas (JOHNS und FORRESTER, 1969). Bei nahezu allen zur Zeit bekannten Trennungsmethoden ist die Gefahr der Kontamination durch diese Proteine gegeben, so daß es recht schwierig erscheint, ein vom Chromatin isoliertes Protein als wirklich chromosomales Protein zu identifizieren. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, wurde das Chromatin nicht direkt aus dem Gewebe (MARUSHIGE und BONNER, 1966), sondern aus zuvor gewonnenen Zellkernen isoliert. Darüberhinaus wurden die Histone insgesamt und die von ihnen abgetrennte lysinreiche Fraktion (F1) gelelektrophoretisch auf ihre Zusammensetzung geprüft. Die erhaltene Bandenverteilung zeigt das für Rattenleberhistone typische Muster (NEIDLE und WAELSCH, 1964). Extrabanden waren nicht nachweisbar. Demgegenüber wurden die Nichthistonproteine nicht näher spezifiziert. Sie stellen die nach der Säureextraktion der Histone und der Entfernung der Nukleinsäuren in 1 N NaOH lösliche Gesamtheit der Kernrestproteine dar.
Zur Deutung von möglichen Kausalverhältnissen zwischen bekannten Tagesrhythmen der Rattenleberzelle und den Tagesrhythmen der Kernproteine sind einige Hinweise auf die bisher bekannten Funktionsweisen dieser Proteine notwendig.
Außer einigen von WANG (1966 und 1967) vorgelegten Daten über die sauren Chromatinproteine sind unsere Kenntnisse über ihre biologischen oder chemischen Eigenschaften, die zu einer Klassifikation führen könnten, nur gering. Dennoch scheint diesen Proteinen eine große

Bedeutung im Zellstoffwechsel zuzukommen: Sie zeigen eine hohe Stoffwechselrate (STEELE und BUSCH, 1963), sie sind im Heterochromatin weniger stark vertreten als im aktiven Euchromatin (FRENSTER, 1965), sie reagieren mit Histonen und könnten deren Gegenspieler bei der DNA-abhängigen RNA-Synthese sein (WANG, 1968; MARUSHIGE et al., 1968), sie scheinen die Hemmwirkung der Histone auf die DNA-abhängige RNA-Synthese aufzuheben (WANG, 1968 und 1970).

Demgegenüber sind die basischen chromosomalen Proteine, die Histone, eingehender untersucht worden (Zusf. STELLWAGEN und COLE, 1969; DeLANGE und SMITH, 1971). Sie besitzen recht einheitliche chemische Eigenschaften. Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Lysin und Arginin aus, während ihnen Tryptophan fehlt. Sie sind leicht zu isolieren und aufzutrennen und dadurch im Gegensatz zu den sauren Chromatinproteinen eindeutig zu charakterisieren. Dennoch sind die genauen Funktionen der Histone, ob gemeinsam oder als Einzelfraktion, nicht eindeutig geklärt. Sie sind struktureller Bestandteil des Chromatins (BRAM und RIS, 1971; SMART und BONNER, 1971). Als Objekte vielfältiger Reaktionen, wie Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung, in deren Folge sich die Struktur und die Aktivität des Chromatins ändert, erweisen sie sich als mögliche Mittler einer Regulationskontrolle auf der Ebene der Replikation und der Transkription.

Ein Rückschluß auf die Funktion von Proteinen könnte aus der zeitlichen Korrelation ihrer Synthese mit anderen Zellprozessen möglich sein: Wenn die chromosomalen Proteine lediglich strukturelle Aufgaben hätten, sollte ihre Synthese jeweils eng mit der der DNA gekoppelt sein. Die chromosomalen Proteine mit regulatorischer Funktion könnten dagegen unabhängig von der DNA synthetisiert werden; der Synthesezeitpunkt könnte dann zum physiologischen Zustand der Zelle Bezug haben. Eine physiologische

Funktion schließt jedoch die Erfüllung struktureller Aufgaben nicht aus, zumal der Wechsel von Aktivitätszuständen des Chromatins mit Strukturänderungen einhergeht.

Der starke Abfall der Gesamtproteinmenge in den Nachmittagsstunden und die zu dieser Zeit gemessenen hohen Einbauraten deuten möglicherweise auf einen Verbrauch dieser Proteine bei genregulierenden Mechanismen hin. Ihre Synthese wäre nach diesen Ergebnissen in die Tagesstunden zu legen und ihr höchster Bedarf in die Nachmittags-und Abendstunden. Sollten diese Proteine bei der Induktion genetischer Aktivität eine Rolle spielen, so hieße das für die RNA-Synthese, daß diese,durch Proteine induziert, bevorzugt in den Abendstunden stattfinden sollte. Da diese Proteine aber selbst synthetisiert werden müssen, wäre für ihre Ersatzsynthese ebenfalls eine RNA-Synthese zu fordern, die vor der Zeit ihres höchsten Bedarfs liegt. Die Analyse der RNA-Synthese ergibt für die mit einem Phenol-NaCl-Gemisch bei 45°C und 65°C extrahierten Fraktionen ein Maximum der Markierung um 19.00 Uhr und ein Minimum am Morgen, während die cytoplasmatische Fraktion sich dazu invers verhält (DÖRING, 1972). Die eigenen Befunde über einen hohen RNA-Gehalt im Chromatin am Morgen und einem geringeren am Abend stehen dazu nicht im Widerspruch. Möglicherweise handelt es sich bei dieser RNA teilweise um naszierende mRNA.

Die getrennte Untersuchung von Histonen und sauren Proteinen könnte uns nähere Aufschlüsse über ihren möglichen Einfluß auf das tagesperiodische Verhalten der RNA und Hinweise auf die ihrem eigenen Stoffwechsel zugrunde liegenden Mechanismen geben.

Eine nennenswerte Histonsynthese ist bisher nur im Zusammenhang mit der DNA-Replikation beschrieben worden und wird als abhängig vom Mitosestadium der Zelle angesehen (IRVIN et al., 1963; STEELE und BUSCH,

1963; CHALKLEY und MAURER, 1965; HNILICA et al., 1965 und 1966; PIHA et al. 1966; ROBBINS und BORUN, 1967). In Geweben mit niedriger Mitoserate, der Leber, des Pankreas und der Niere, ist der Einbau radioaktiver Aminosäuren in Histone wesentlich langsamer als in die sauren chromosomalen Proteine oder die Proteine des Cytoplasmas. In mitotisch aktivem Gewebe, wie regenerierender Rattenleber oder Tumoren gleicht die Einbaurate in Histone nahezu der anderer Proteinarten.

Demgegenüber fanden GURLEY und HARDIN (1969 und 1970) bei ihren Experimenten mit exponentiell wachsenden Zellkulturen, daß von den zuvor markierten Histonen die Fraktion F1 schneller durch nichtmarkierte F1 ersetzt wurde als die anderen Histone, die weitgehend konstant abnahmen. Diese Beobachtungen werden dahingehend gedeutet, daß die Histonfraktion F1 nicht nur eine die Chromatinstruktur aufrechterhaltende Funktion (BONNER et al., 1968) hat, sondern eine, die RNA-Synthese betreffende, dynamische Funktion, die ihren kontinuierlichen Ersatz im Chromatin erfordert.

Bei der Deutung der Einbauraten für die Histone und die sauren Proteine scheint es mir wichtig darauf hinzuweisen, daß die Markierungszeit vier Stunden betrug und ein Vergleich zweier in ihrer Stoffwechselaktivität unterschiedliche Proteinarten aus diesem Grunde nicht unmittelbar vorgenommen werden kann. Während für die sauren Proteine das Einbaumaximum bereits nach 2 Stunden überschritten wird (Abbildung 7), ist für die Histone das Maximum auch nach 4 Stunden noch nicht erreicht.

Bei einem Vergleich der Einbauraten in die Histone und die Nicht-Histon-Proteine muß ebenso beachtet werden, daß als radioaktive Vorstufe ^{3}H-Lysin verwendet wurde, welches stärker in die Histone als in die sauren Proteine eingebaut wird (SMITH und KING, 1970).

Tagesperiodische Schwankungen des Gehalts an freiem Lysin im Cytoplasma von Rattenleberzellen wurden von EHRHARDT (1973) beschrieben. Gegenüber einem Minimum gegen 14.00 Uhr weist er einen signifikant höheren Lysingehalt mit einem Maximum um 22.00 Uhr nach. Die von mir zwischen 20.00 und 24.00 Uhr genessenen niedrigen Einbauraten in die Histone könnten darauf zurückzuführen sein, daß die injizierte Lysinmenge innerhalb des Cytoplasmas zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Verdünnung erfährt als in den Nachmittags- und Abendstunden, in denen die höchsten Einbauwerte für alle untersuchten Proteine liegen (vergl. SCHMID und MAURER, 1973).

Da im einzelnen über die subzellulären Syntheseorte der verschiedenen chromosomalen Proteine nur wenig bekannt ist und einander widersprechende Befunde vorliegen (vergl. STELLWAGEN und COLE, 1969), ergibt sich daraus auch eine Unsicherheit in der Beantwortung der Frage, ob die Vorläufer für die Synthese der Histone und der sauren Proteine aus dem gleichen Pool innerhalb der Zelle stammen.

Daneben müssen die Ergebnisse von KITTLICK (1970) berücksichtigt werden, der eine von der Tageszeit abhängige Permeabilität der Membran von Rattenleberzellkernen nachweist. Danach wäre ein Einfluß der Kernmembran sowohl auf die Synthese von RNA im Zellkern und deren Wanderung ins Cytoplasma als auch auf den Transport von im Cytoplasma synthetisierter Proteine zum Chromatin nicht auszuschließen. Die höhere Permeabilität vor Beginn und während der Dunkelzeit gegenüber den Vormittagsstunden läßt sich mit meinen Befunden der Proteinschwankungen im Zellkern vereinbaren. Der hohe Gehalt von RNA im Zellkern in den Morgenstunden könnte auf die zu diesem Zeitpunkt niedrigste Permeabilität zurückzuführen sein, während die von DÖRING (1972) in den frühen Abendstunden gemessene hohe Markierung sich deshalb nicht stärker im Gehalt um 20.00 Uhr

niederschlägt, weil aktive Transportprozesse eine Akkumulation im Kern verhindern.

Die Mengenangaben sind auf den DNA-Gehalt der jeweiligen Analysen bezogen. Die für die Untersuchungen verwandten Tiere waren ausgewachsene Ratten, bei denen nachweislich die Mitoserate in der Leber unter 1% liegt, und daher Einflüsse der DNA-Synthese kaum ins Gewicht fallen dürften. Da aber außer Angaben über gleiche Konzentrationen von DNA während 24 Stunden (DÖRING und RENSING, 1973), Befunde über mögliche tagesperiodische Schwankungen im DNA-Gehalt vorliegen (RUBY et al., 1973), wurden die Werte der einzelnen Fraktionen auch auf die spezifische Proteinart bezogen (Vergl. Abbildungen 3 und 4).

Die bisher vorgelegten Befunde über das DNA-Histon-Verhältnis weisen auf eine Konstanz dieses Verhältnisses hin. Eine Mitteilung aller erhaltenen Werte (siehe Tabelle Seite 20) erweist sich als übereinstimmend mit diesen Befunden, läßt aber bei den unabhängig an verschiedenen Tagen zum gleichen Zeitpunkt getöteten Tieren Abweichungen erkennen, die darauf hinweisen, daß Histone nicht nur die ihnen vorwiegend zugeschriebene strukturerhaltende Funktion haben. Diesem Tagesrhythmus könnte eine regulatorische Funktion zugrunde liegen.
Die gefundenen Abweichungen der Histonmenge zu verschiedenen Tageszeiten könnten jedoch auch auf eine unterschiedliche Extrahierbarkeit dieser Proteine zurückgeführt werden, die möglicherweise durch eine veränderte Bindungsfähigkeit bei der Interaktion mit anderen Molekülen hervorgerufen wird. Nach histologischen und elektronenoptischen Untersuchungen gibt es bisher keine Anhaltspunkte, daß aktives Chromatin weniger Histon enthält als nicht RNA-synthetisierende Bereiche (FRENSTER, 1965; JOHNS, 1972). Vorstellbar wäre eine leichtere Extrahierbarkeit chromosomaler Proteine aus den aufgelockerten euchromatischen

Teilen des Chromatins. Diese Möglichkeit ließe bei Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse den Schluß zu, daß eine tagesperiodische Euchromatisierung heterochromatischer Bereiche auftritt, vergleichbar den tagesperiodischen Änderungen des Puffmusters von Speicheldrüsenchromosomen aus Drosophila (RENSING und HARDELAND, 1967; NAGEL, 1973). Ob dieser Wechsel aber mit derartig hohen Schwankungen im extrahierbaren Protein einhergeht, scheint jedoch unwahrscheinlich.

Ein Vergleich der Kurven der Histonmenge und der Menge der sauren Proteine zeigt für den Zeitpunkt 20.00 Uhr entgegengesetzte Werte. Während die Histonmenge zu diesem Zeitpunkt nach relativ hohen Syntheseraten akkumuliert, ist für die sauren Proteine um 20.00 Uhr ein Minimum festzustellen. Nach den bisherigen Ergebnissen würde das aber eine Hemmung der RNA-Synthese zur Folge haben (MARUSHIGE et al., 1968; WANG, 1968 und 1970). Dabei ist aber zu beachten, daß die Histonfraktion F1zu diesem Zeitpunkt eine nur geringe Menge aufweist, die erst um 24.00 Uhr einen Gipfel erreicht. Die Menge der übrigen Histone nimmt dagegen von 20.00 bis 4.00 Uhr stetig ab. Das könnte auf eine für die F1 von den übrigen Histonen unterschiedliche Funktion hindeuten. Interessanterweise korrelieren die Minima der F1 mit den höchsten für die RNA gemessenen Werten.

Dieses unterschiedliche Verhalten der F1 gegenüber den restlichen Histonen zeigt sich auch bei dem beobachteten Tagesrhythmus der Phosphorylierung von Histonen (LETNANSKY und REISINGER, 1972). Während für die F1 ein Maximum bereits in den Nachmittagsstunden um 16.00 Uhr nachgewiesen wird, zeigen die übrigen Histone erst in den Abendstunden um 21.00 Uhr den höchsten Einbau von ^{32}P. Leider geben die Autoren zwischen 16.00 und 21.00 Uhr keine Werte an, so daß möglicherweise das Maximum der übrigen Histone früher liegt.

Die Wirkung der Phosphorylierung und der damit einhergehenden Neutralisierung der als Polykationen fungierenden Histone wird in der Lösung von Bindungen zwischen Histonen und der DNA gesehen. Die auftretende Auflockerung des Chromatins scheint eine Voraussetzung für die Wirkung der RNA-Polymerase auf ihr Substrat zu sein.

Die Abnahme der Histonmenge, die bei der F1 um 12.00 Uhr und bei den übrigen Histonen erst um 20.00 Uhr beginnt, müßte nicht unbedingt auf einer in vivo erfolgten vollständigen Lösung der Histone vom Chromatin beruhen. Sie könnte mit der zu diesen Zeiten beobachteten höheren Phosphorylierung und einer möglicherweise dadurch bedingten leichteren Extrahierbarkeit dieser Proteine während des Waschens der Zellkerne begründet werden.

Das zu beobachtende Vorkommen von stark markierter F1 um 20.00 Uhr am Chromatin in nur geringer Menge deutet auf einen hohen Umsatz dieser Fraktion zu diesem Zeitpunkt hin. Die quantitative Zunahme relativ schwach markierter F1 um Mitternacht könnte auf Transportprozesse von zuvor synthetisiertem und daher nicht markiertem Protein zurückzuführen sein, zumal für diese Fraktion Hinweise auf extrachromosomale Pools vorliegen (GURLEY und HARDIN, 1970).

Interessanterweise fallen die Phosphorylierungsmaxima der Histone am Abend mit dem Vorkommen stark markierter saurer Proteine am Chromatin zusammen. Zur gleichen Zeit messen GLASSER und SPELSBERG (1972) das Aktivitätsmaximum der RNA-Polymerase II aus dem Karyoplasma von Rattenleberzellkernen, stellt KITTLICK (1970) eine hohe Kernmembranpermeabilität fest und findet DÖRING (1972) ebenfalls in der Rattenleber das Synthesemaximum der 45°C und 65°C RNA-Fraktionen. Auffälligerweise liegen die Maxima verschiedener Enzymaktivitäten, besonders der Enzyme des Glycogenstoffwechsels, in der ersten Hälfte der Dunkelzeit (HARDELAND et al. 1973).

Die folgende Aufstellung ermöglicht einen Vergleich der vorgelegten Befunde mit anderen Zellfunktionen der Rattenleber in Abhängigkeit von der Tageszeit. Wo es erforderlich war, wurden die Ergebnisse anderer Autoren auf einen Licht-Dunkel-Wechsel von 12 Stunden und eine Dunkelzeit von 18.00 bis 6.00 Uhr umgerechnet.

Tagesperiodische Funktionen einiger Zellbestandteile der Rattenleber		Tageszeit des Maximums	Tageszeit des Minimums
Nichthiston-Proteine			
	Markierung	12.00 - 20.00	24.00 - 4.00
	Menge	24.00	20.00
Lysinreiche Histonfraktion (F1)			
	Markierung	16.00 - 20.00	20.00 - 24.00
	Phosphorylierung	16.00	24.00
	Menge	24.00 u. 12.00	20.00 u. 8.00
Resthistone			
	Markierung	8.00 - 20.00	20.00 - 24.00
	Phosphorylierung	21.00	24.00
	Menge	20.00	16.00 u. 4.00
Kernmembranpermeabilität (1)		12.00 - 6.00	7.00 - 10.00
RNA-Polymerase II	Aktivität (2)	18.00 - 21.00	11.00
RNA-Synthese der 45°C- und 65°C-Fraktionen			
	Markierung (3)	19.00 u. 7.00	11.00
Chromatin-RNA	Menge	8.00 u. 20.00	16.00
Cytoplasma-RNA	Markierung (3)	9.00 - 12.00	21.00 - 24.00
Gesamt-RNA	Menge (3)	15.00	6.00
Cytoplasma-Protein	Markierung (4)	21.00 - 24.00	24.00 - 3.00
Tryptophan-Pyrrolase	Aktivität (5)	24.00	9.00
Tyrosin Transaminase	Aktivität (6)	23.00	15.00

(1) KITTLICK (1970); (2) GLASSER und SPELSBERG (1972); (3) DÖRING (1972)
(4) BECKMANN (1972); (5) HARDELAND (1969); (6) WURTMAN und AXELROD (1967)

Als periodische Signale, die von außerhalb der Zelle die Tagesrhythmen der Kernproteine steuern könnten, sind vor allem Hormone zu nennen. TENG und HAMILTON (1969) sehen die Wirkung des Östrogens in ovarektomierten Ratten in einer Steigerung der Synthese von sauren Chromatinproteinen, die dem inhibitorischen Effekt der Histone auf die Transkription in den Zellkernen des Uterus entgegenwirken, woraus eine gesteigerte RNA-Synthese resultiert. Der Anstieg der Synthese der sauren Proteine in der Rattenleber könnte auf den entsprechenden Anstieg von Glucagon und/oder Hydrocortison zurückzuführen sein. Auch die Befunde von HELMSING (1972) zeigen nach in vitro Incubation mit ß-Ecdyson das Auftreten einer spezifischen Proteinfraktion in den Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila hydei. Unter der Wirkung des Glucagons zeigen ENEA und ALLFREY (1973) die Synthese von zwei sauren Chromatinproteinen, die sich von der durch Hydrocortison induzierten Fraktion in ihren Molekulargewichten unterscheiden. Das könnte ein Hinweis auf eine unterschiedliche Wirkungsweise von Steroid- und Peptidhormonen auf die Zellkerne desselben Zielgewebes sein.

Über einen möglichen Einfluß des Hydrocortisons auf die Steigerung der Acetylierung besonders argininreicher Histone berichten ALLFREY (1966), POGO et al. (1968) und ALLFREY (1969). Eine Phosphorylierung unter der Wirkung dieses Hormons findet hingegen bevorzugt an den lysinreichen Histonen statt (STEVELY und STOCKEN, 1968). LANGAN (1969) fand, daß auch die Verabfolgung von Glucagon an Ratten einen ausgeprägten Anstieg der Phosphorylierung eines Serinrestes der F1 in der Rattenleber zur Folge hat. Diese F1-Phosphorylierung ist nach LANGAN der Mechanismus, durch den Glucagon eine RNA-Synthese im Zielgewebe induziert. Die Hormonwirkung wird durch cyklisches AMP übertragen, welches die Rate der Phos-

phorylierung von Histonen durch Histon-Kinasen stimuliert (LANGAN, 1968 und 1969; KLEIN und MAKMAN, 1971). Über die stimulierende Wirkung des cAMP auf die RNA-Synthese in isolierten Rattenleberkernen berichten DOKAS und KLEINSMITH (1971). Damit wäre vielleicht ein Bindeglied zwischen der Histonphosphorylierung, dem Einbau von Nichthiston-Proteinen in das Chromatin, der Steigerung der RNA-Synthese, der Stimulierung der Proteinsynthese und der Erhöhung von Enzymaktivitäten und der Wirkung einiger Hormone auf diese Prozesse gefunden.

Bei der Diskussion eines hormonellen Einflusses auf die Tagesperiodik sollte aber beachtet werden, daß eine tagesperiodische Proteinsynthese auch in Einzellern, Gewebekulturen und isolierten Gewebszellen nachgewiesen ist (HASTINGS, 1960; ANDREWS et al., 1964; VOLM, 1964; STURMWASSER, 1965; SWEENEY, 1965; WILKINS et al., 1965), und nicht die Synthese aller Proteine höherer Organismen durch Hormone stimuliert werden kann. Jedoch unterliegt das Chromatin eines arbeitsteiligen Organismus der Kontrolle zellulärer und extrazellulärer Faktoren. Den Hormonen käme dabei die Funktion zu, Stoffwechselprozesse verschiedener Gewebe zu synchronisieren.

Noch sind unsere Kenntnisse über die einzelnen im Chromatin assoziierten Bestandteile zu lückenhaft und unsere Vorstellungen vielleicht zu schematisch, um ein gültiges Bild über die im Zellkern wirkenden und von ihm ausgehenden Regelprozesse zu entwerfen. Daß bei diesen Prozessen den Histonen und den sauren Proteinen eine zumindest vermittelnde Funktion zugeschrieben werden muß, steht außer Zweifel. Sie sind jedoch wahrscheinlich keine sich selbst regulierenden Bestandteile des Chromatins.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Menge der Proteine aus Zellkernen der Rattenleber schwankt tagesrhythmisch. Ausgehend von einem Maximum um 24.00 Uhr verzeichnet sie bis 4.00 Uhr einen leichten Abfall und hält sich bis zum Mittag auf etwa dem gleichen Niveau, um danach um 16.00 Uhr ihren niedrigsten Wert zu erreichen.

2. Die Messung des in vivo Einbaues von ^{3}H-Lysin in die Gesamtprotein-Fraktion ergibt tagesperiodische Schwankungen mit der stärksten Markierung zwischen 12.00 und 16.00 Uhr und einer schwächeren zwischen 20.00 und 24.00 Uhr.

3. Geringe quantitative Schwankungen über 24 Stunden zeigt der Histongehalt der Zellkerne. Das Histon-DNA-Verhältnis bewegt sich zwischen 1,065 um 16.00 Uhr und 1,196 um 20.00 Uhr.

4. Der Einbau von ^{3}H-Lysin in die Histone zeigt einen tagesrhythmischen Verlauf mit höchsten Markierungsraten zwischen 16.00 und 20.00 Uhr und niedrigsten zwischen 20.00 und 24.00 Uhr.

5. Für die Histonfraktion F1 und die übrigen Histone zeigen sich tagesrhythmische Mengenschwankungen. Jedoch ist der Kurvenverlauf nicht parallel. Während die lysinreiche Fraktion von 20.00 bis 24.00 Uhr eine Zunahme verzeichnet, akkumulieren die restlichen Histone bereits vier Stunden früher. Daraus ergibt sich eine inverse Lage der Extremwerte.

6. Die in vivo Inkorporation von ^{3}H-Lysin in die lysinreiche Histonfraktion zeigt ausgeprägte tagesperiodische Unterschiede mit einem deutlichen Gipfel bei den um 20.00 Uhr getöteten Tieren und einem Minimum zwischen 20.00 und 24.00 Uhr.

7. Die Einbaurate in die übrigen Histone ist zu jeder Tageszeit niedriger als die der F1. Sie zeigt keine so deutlichen Schwankungen, ist aber während der Nacht signifikant niedriger als tagsüber.

8. Die aus den Zellkernen nach der Histonextraktion isolierten sauren Chromatinproteine zeigen tagesperiodische Mengenschwankungen. Ausgehend von einem Protein-DNA-Verhältnis von 0,699 um Mitternacht sinkt der Anteil dieser Proteine kontinuierlich bis auf den Wert 0,523 um 20.00 Uhr ab. Ein Vergleich des Kurvenverlaufs mit dem der lysinreichen Histone zeigt eine weitgehende Parallelität bis auf den 8.00 Uhr-Punkt.

9. Die Bestimmung des RNA-Gehalts der Zellkerne nach dem Waschen ergibt deutliche tagesrhythmische Veränderungen mit einem maximalen Gehalt um 8.00 Uhr und einem minimalen vor dem abendlichen Licht-Dunkel-Wechsel.

10. Die gefundenen Tagesrhythmen werden unter dem Gesichtspunkt methodischer Einflüsse und im Zusammenhang mit weiteren zellulären Prozessen und interzellulären Wechselwirkungen diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

ALLFREY, V.G. (1966): Control mechanisms in ribonucleic acid synthesis. Cancer Res. 26, 2026-2040

ALLFREY, V.G. (1969): The role of chromosomal proteins in gene activation. In: Biochemistry of Cell Division pp 179-205. Eds. R.BASERGA and C. THOMAS, Springfield Illinois.

ANDREWS, R.V. and G.E.J. FOLK (1964): Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. Comp. Biochem. Physiol. 11, 393-409

BONNER, J., M.E. DAHMUS, D. FAMBROUGH, R.C. HUANG, K. MARUSHIGE and D.Y.H. TUAN (1968): The biology of isolated chromatin. Science 159, 47-56

BRAM, S. and H. RIS (1970): On the structure of nucleohistone. J. Mol. Biol. 55, 325-336

BUSCH, H., K.HIGASHI, S.T. JACOB, T. NAKAMURA, S.M. SCHWARTZ and S.J SMITH (1966): Nuclear RNA, histones and differentiation. In: Molekulare Biologie des malignen Wachstums pp 17-42. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

CHALKLEY, G.R., and H.R. MAURER (1965): Turnover of template-bound histone. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 54, 498-505

CHAUVEAU, J., Y. MOULE, and CH. ROUILLER (1956): Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition. Exptl. Cell Res. 11, 317-321

CHEDID, A. and V. NAIR (1972): Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver; electron microscopic study. Science 175, 176-179

DAHMUS, M.E. and J. BONNER (1965): Increased template activity of liver chromatin, a result of hydrocortison administration. Proc. Natl. Acad. Sci. US 54, 1370-1375

GREENGARD, O., M.A. SMITH, and G. ACS (1963): Relation of cortison and synthesis of ribonucleic acid to induced and developmental enzyme formation.
J. Biol. Chem. 238, 1548-1551

GREENMAN, D.L., W.D. WICKS and F.T. KENNEY (1965): Stimulation of RNA synthesis by steroid hormones. II. High molecular weight components.
J. Biol. Chem. 240, 4420-4427

GURLEY, L.R. and J.M. HARDIN (1969): The metabolism of histone fractions. II. Conservation and turnover of histone fractions in mammalian cells.
Arch. Biochem. 130, 1-6

GURLEY, L.R. and J.M. HARDIN (1970): The metabolism of histone fractions. III. Synthesis and turnover of histone F1.
Arch. Biochem. Biophys. 136, 392-401

HARDELAND, R. (1969): Circadiane Rhythmik und Regulation von Enzymen des Tryptophan-Stoffwechsels in Rattenleber und -niere.
Z. vergl. Physiologie 63, 119-136

HARDELAND, R., D.HOHMANN und L. RENSING (1973): The rhythmic organisation of rodent liver. A review.
J. interdiscipl. Cycle Res. im Druck

HARDELAND, R. (im Druck): Circadian rhythmicity in cultured liver cells. I. Rhythmicity in tyrosine aminotransferase activity and inducibility and in ^{3}H-Leucin incorporation.

II. Reinduction of rhythmicity in tyrosine aminotransferase activity.
Int. J. Biochem. im Druck

HASTINGS, J.W. (1960): Biochemical aspects of rhythms: Phase shifting by chemicals.
Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 25, 131-143

HELMSING, P.J. (1972): Induced accumulation of non-histon proteins in polytene nuclei of Drosophila hydei. II. Accumulation of proteins in polytene nuclei and chromatin of different larval tissues.
Cell Differentiation 1, 19-24

HNILICA, L.S., L.S. EDWARDS, and A.E. HEY (1966): Studies on nuclear proteins. II Quantitative distributions of histone fractions in various tissues.
Biochem. Biophys. Acta 124, 109-117

HNILICA, L.S., H.A. KAPPLER, and V.S. HNILICA (1965): Biosynthesis of histones and acidic nuclear proteins under different conditions of growth.
Science 150, 1470-1472

HOLTON, D. and KENNEY, F.T. (1967): Regulation of tyrosin -ketoglutarate transaminase in rat liver. VI. Induction by pancreatic hormones.
J. Biol. Chem. 242, 4372-4377

IRVIN, J.L., D.J. HOLBROOK jr., J.H. EVANS, H.C. McALLISTER, and E.P. STILES (1963): Possible Role of histones in regulation of nucleic acid synthesis.
Exptl. Cell Res. Suppl. 9, 359-366

JOHNS, E.W. (1964): Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractionations from calf thymus.
Biochem. J. 92, 55-59

JOHNS, E.W. and S. FORRESTER (1969): Studies on nuclear proteins. The binding of extra acidic proteins to deoxyribonucleoprotein during the preparation of nuclear proteins.
Europ. J. Biochem. 8, 547-551

JOHNS, E.W. (1972): Histones, chromatin structure and RNA-synthesis.
Nature new Biology 237, 87-88

KENNEY, F.T. and F.J. KULL (1963): Hydrocortison-stimulated synthesis of nuclear RNA in enzyme induction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 493-499

KITTLICK, P.D. (1970): Untersuchungen über die tageszeitliche Änderung der Membranpermeabilität von Rattenleberzellkernen.
Exp. Path. 4, 143-154

KLEIN, M.J. and M.H. MAKMAN (1971): Adenosine 3',5'-monophosphat-dependent protein kinase of cultured mammalian cells.
Science 172, 863-864

LANGAN, T.A. (1968): Histone phosphorylation: Stimulation by adenosin 3',5' monophosphat.
Science 162, 579-580

LANGAN, T.A. (1969): Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 1276-1283

LeBOUTON, A.V. and S.D. HANDLER (1970): Diurnal incorporation of ^{3}H-leucin into liver protein.
FEBS-letters 10, 78-80

LeBOUTON, A.V. and S.D. HANDLER (1971): Persistent circadian rhythmithity of protein synthesis in the liver of starved rats.
Experientia (Basel) 27, 1031-1032

LETNANSKY, K. und L. REISINGER (1972): Circadian rhythms in the phosphorylation of rat liver histones and similar basic proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 312-320

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

MARUSHIGE, K. and J. BONNER (1966): Template properties of liver chromatin.
J. Mol. Biol. 15, 160-174

MARUSHIGE, K., D. BRUTLAG, and J. BONNER (1968): Properties of chromosomal nonhistone protein of rat liver.
Biochemistry, 7, 3149-3155

NEIDLE, A. and H. WAELSCH (1964): Histones: Species and tissue specifity.
Science, 145, 1059-1061

NAGEL, G. (1973): Unveröffentlicht

PETERKOFSKY, B. and G.M. TOMKINS (1967): Effect of inhibitors of nucleic acid sythesis on steroid-mediated induction of tyrosin aminotransferase in hepatoma cell cultures.
J. Mol. Biol. 30, 49-61

PETERKOFSKY, B. and G.M. TOMKINS (1968): Evidence for the steroid-induced accumulation of tyrosin aminotransferase messenger RNA in the absence of protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 222

PINA, R.S., H. CUÉNOD, and H. WAELSCH (1966): Metabolism of histones of brain and liver.
J. Biol. Chem. 241, 2397-2404

POGO, B.G.T., A.O. POGO, V.G. ALLFREY, and A. MIRSKY (1968): Changing patterns of histone acetylation and RNA-synthesis in regeneration of the liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 1337-1344

REISFELD, R.A., U.J. LEWIS, and D.E. WILLIAMS (1962): Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels.
Nature 195, 281-283

RENSING, L. (1967): Neuere Ergebnisse zur Cytologie, Biochemie und Zellphysiologie circadianer Rhythmen.
Nachr. Acad. Wiss. Göttingen, math. phys. Kl. 103-105

RENSING, L. und R. HARDELAND (1967): Zur Wirkung der circadianen Rhythmik auf die Entwicklung von Drosophila.
J. Insect Physiol. 13, 1547-1568

RENSING, L. (1973): Periodic geophysical and biological signals as Zeitgeber and exogenous inducers in animal organisms.
Proc. 6. Intern. Biometeorol. Congr. II. im Druck

ROBBINS, E. and T.W. BORUN (1967): The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 409-416

RUBY, J.R., L.E. SCHEVING, S.B. GRAY, and K. WHITE (1973): Circadian rhythm of nuclear DNA in adult rat liver.
Exptl. Cell Res. 76, 136-142

SCHMID, G. und W. MAURER (1973): Prozentuale Beteiligung von exogenem Cytidin an der RNS-Synthese der Leber der Ratte. Exptl. Cell Res. 78, 143-151

SHIEKO, S., P. KOIVISTOINEN, C.A. TRAINYLK, A.R. NEWHALL, and L. FRIEDMAN (1967): A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. Analyt. Biochem. 19, 514-528

SMART, J.E. and J. BONNER (1971): Studies on the role of histones in the structure of Chromatin. J. Mol. Biol. 58, 661-674

SMITH, J.A. and R.J.B. KING (1970): Nuclear proteins and their metabolism in hormone responsive and unresponsive BR6 mouse mammary tumors. Brit. J. Cancer 24, 861-868

STEELE, W.J. and H. BUSCH (1963): Studies on acidic nuclear proteins of the Walker tumor and liver. Cancer Res. 23, 1153-1163

STELLWAGEN, R.H. and R.D. COLE (1969): Chromosomal Proteins. Ann. Rev. Biochem. 38, 951-990

STEVELY, W.S. and L.A. STOCKEN (1968): Variations in the phosphate content of histone F1 in normal and irradiated tissues. Biochem J. 110, 187-191

STURMWASSER, F. (1965): The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron. In: Circadian Clocks. Ed: J. Aschoff, North Holland, Amsterdam, pp 442-462

SWEENEY, B.M. (1965): Rhythmicity in the biochemistry of photosynthesis of Gonyaulax. In: Circadian Clocks. Ed: J. Aschoff, North Holland, Amsterdam, pp 190-194

TENG, C.S. and T.H. HAMILTON (1969): Role of chromatin in estrogen action in the uterus. II. Hormone-induced synthesis of nonhistone acidic proteins which restore histone-inhibited DNA-dependent RNA synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 465-472

VOLM, M. (1964): Die Tagesperiodik der Zellteilung von Paramecium bursaria.
Z. vergl. Physiol. 48, 157-180

WANG, T.Y. (1966): Solubilization and characterization of the residual proteins of the cell nucleus.
J. Biol. Chem. 241, 2913-2917

WANG, T.Y. (1967): The isolation, properties, and possible functions of chromatin acidic proteins.
J. Biol. Chem. 242, 1220-1226

WANG, T.Y. (1968): Restoration of histone-inhibited DNA-dependent RNA synthesis by acidic proteins.
Exptl. Cell Res. 53, 288-291

WANG, T.Y. (1970): Activation of transcription in vitro from chromatin by non-histone-proteins.
Exptl. Cell Res. 61, 455-457

WILKINS, M.B. and A.W. HOLOWINSKY (1965): The occurence of an endogenous circadian rhythm in a plant tissue culture.
Plant Physiol. 40, 907-909

WURTMAN, R.J. and J. AXELROD (1967): Daily rhythmic changes in tyrosin transaminase activity of the rat liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 1594-1598

Lebenslauf

Am 11. Januar 1940 wurde ich, Peter Rzepka, als Sohn des Assessors jur. Alfons Rzepka und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Niechziol, in Brandenburg (Havel) geboren.

Ab Herbst 1946 besuchte ich die Grundschule in Brandenburg, die ich nach bestandener Abschlußprüfung im Sommer 1954 verließ. Mein Gesuch um Aufnahme in die Oberschule wurde abgelehnt, weil ich kein Arbeiterkind war. Im September 1954 begann ich die Lehre zum Apothekenhelfer in der Apotheke des Krankenhauses für Psychiatrie in Brandenburg-Görden. Durch die Umsiedlung unserer Familie in die Bundesrepublik im Dezember 1955 brach ich die Lehre ab.

Nach dem Besuch der zweijährigen Handelsschule des Kreises Ahrweiler bereitete ich mich auf die externe Reifeprüfung vor. In Frankfurt (Main) besuchte ich dazu ab 1960 Abiturvorbereitungslehrgänge und bestand im Oktober 1962 die Reifeprüfung für Nichtschüler an der Oranienschule - Gymnasium für Jungen - in Wiesbaden.

Im Wintersemester 1962/63 nahm ich das Studium der Germanistik und der Biologie an der Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn auf. Nach dem dritten Semester setzte ich mein Studium an der Georg-August-Universität in Göttingen fort und entschied mich hier für die Fächerkombination Zoologie, Botanik und Chemie.

Die Großpraktika absolvierte ich in Zoologie (2 Semester) unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. Ax, Herrn Professor Dr. G. Birukow und Herrn Professor Dr. F. Schlote, in Botanik (1 Semester) unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Pirson und in Chemie (2 Semester) unter der Leitung von Herrn Professor Dr. O. Glemser.

Im Dezember 1969 legte ich die wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien ab. Meine experimentelle Staatsexamensarbeit über "Methoden zur biochemischen Analyse der Kernproteine" fertigte ich unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Rensing im biochemischen Labor des I. Zoologischen Instituts an.

Am 9. Dezember 1969 wurde mir die Verwaltung einer vakanten wissenschaftlichen Assistentenstelle am I. Zoologischen Institut übertragen. Ich leitete die Bibliothek der beiden Zoologischen Institute, war im Unterricht tätig und führte meine Forschungsarbeit fort.

Im März 1970 bewarb ich mich um eine freie Dozentenstelle für Biologie an der Max-Eyth-Schule - Ingenieurschule für Landbau - in Witzenhausen. Nach einem Berufungsverfahren wurde ich dort am 1. Oktober 1970 als Studienrat eingestellt.